

Maxadilan peptidek kémiai szintézise és analitikai vizsgálatai

The Chemical Synthesis and Analytical Investigation of Maxadilan Peptides

Sinteza chimică și studiul analitic a peptidelor de tip Maxadilan

Dr. SZOLOMÁJER János^{1,2} tudományos segédmunkatárs, HEGYI Orsolya¹ PhD hallgató,
Dr. KELE Zoltán¹ egyetemi adjunktus, Prof. Dr. TÓTH Gábor¹ intézetvezető egyetemi tanár

¹ SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet, Szeged 6720, Dóm tér 8,

Tel: 62-545136, Fax: 62-545971, <http://www.mdche.u-szeged.hu>

² MTA-SZTE Szupramolekuláris és nanoszerkezetű anyagok kutatócsoport

ABSTRACT

*The research of vasoactive peptides is more and more important because of their widespread effect. Blood-feeding arthropods produce vasoactive compounds in their salivary glands, they serve to counteract the hemostatic processes of the host, when the arthropod obtains a blood meal. The sand flies are vector of leishmaniasis, the major parasitic diseases with several hundred thousand cases occurring annually. In 1991 analysing the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia Longipalis* a 61-amino acid long peptide (containing 2 disulfide bridges) was isolated, which is 500 times more potent vasodilator than the calcitonin gene-related peptide (CGRP) and therefore later it was labelled as Maxadilan. Although there is a very little amino acid sequence homology with pituitary adenylate cyclase activating polipeptide, maxadilan acts as an agonist of type 1 receptor (PAC1) of PACAP and the maxadilan analogue (termed maxadilan 65; amino acids deleted in position 24-42) is a specific antagonist of PAC1. In this presentation the chemical synthesis and mass spectrometric analysis of 61 amino acid containing maxadilan (Maxa61) are described.*

Keywords: vasoactive peptides, Maxa61, Maxa65, PACAP receptors

ÖSSZEFOGLALÓ

Az érrendszerre hatást gyakorló peptidek (vazoaktív peptidek) vizsgálata egyre fontosabb és elterjedtebb a széleskörű hatásuk miatt. A vérrel táplálkozó ízeltlábúak, vazoaktív komponenseket termelnek nyálmirigyekben, amelyek a táplálkozás során a gazdaszervezet hemosztatikus folyamatait gátolják (véralvadásgátlás). A homoki légy a *leishmaniasis* parazita hordozója, amely az egyik legelterjedtebb, több százéves éves nagyságrendben előforduló parazitafertőzés okozója. 1991-ben a *Lutzomyia Longipalis* nyálmirigyait vizsgálva, egy 61 aminosavból álló, két diszulfid hidat tartalmazó polipeptidet izoláltak, amelyet később elneveztek Maxadilannak. Az izolált polipeptid 500-szor hatásosabb értágító hatással rendelkezett, mint az irodalomban addig közölt calcitonin-gén kapcsolt peptid (CGRP). Habár a Maxadilan nem mutat nagymértékű szekvencia analógiát a hipofízis adenil-cikláz aktiváló polipeptiddel (PACAP), a maxadilan a fent említett polipeptid 1-es típusú receptor agonistája, valamint a szekvencia módosított (24-42 közötti rész eltávolítva) maxadilan analóg (Maxadilan 65) specifikus antagonistája a PAC1 receptornak. Jelen prezentációban a 61 aminosavból álló Maxadilan (Maxa61) kémiai szintézisét, valamint tömegspektrometriás szerkezetigazoló vizsgálatait tárgyaljuk.

Kulcsszavak: vazoaktív peptidek, Maxa61, Maxa65, PACAP receptorok

1. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

1.1. A maxadilan azonosítása

Az érrendszerre hatást gyakorló peptidek (vazoaktív peptidek) vizsgálata egyre fontosabb és elterjedtebb a széleskörű hatásuk miatt. A vérrel táplálkozó ízeltlábúak vazoaktív komponenseket termelnek nyálmirigyekben,

amelyek a táplálkozás során a gazdaszervezet hemosztatikus folyamatait gátolják (véralvadás-gátlás). A csípés következtében egy gyorsan kialakuló és hosszan tartó bőrpír illetve bőrgyulladás keletkezik, amelyet helyi véralvadás-gátlás kísér. A homoki légy (*Lutzomyia Longipalis*) a leishmaniasis parazita hordozója, amely az egyik legelterjedtebb, több százezres éves nagyságrendben előforduló parazitafertőzés okozója. Lerner és munkatársai azonosították a fent említett hatásért felelős molekulát. RP-HPLC segítségével a homoki légy nyál-extraktumait fracionálták, majd a megfelelő frakciókat kísérleti nyulak bőrébe injektálták. A tartós bőrgyulladást okozó frakcióban azonosítottak egy vazóaktív peptidet, amelyet maxadilannak neveztek el a kimagasló hatékonysága miatt. A maxadilan 500-szor hatásosabb értágító hatással rendelkezett, mint az irodalomban addig közölt kalcitonin-gén kapcsolt peptid (CGRP). Továbbá a maxadilan peptid pikogramnyi mennyisége emberi bőrbe injektálva, 48 órán át tartó bőrpírt valamint bőrgyulladást okozott.



1. ábra

A homoki légy (Lutzomyia Longipalis) táplálkozás közben

A CGRP valamint a maxadilan N-terminális felőli része hasonló szekvencia részt tartalmaz. Habár a Maxadilan nem mutat nagymértékű szekvencia analógiát a hipofízis adenil-cikláz aktiváló polipeptiddel (PACAP), a maxadilan a fent említett polipeptid 1-es típusú membrán receptor agonistája, valamint a szekvencia módosított (24-42 közötti rész eltávolítva) maxadilan analóg (Maxadilan 65) specifikus antagonistája a PAC1 receptornak. Amíg a PACAP aktiválja a VPAC1 és VPAC2 receptorokat, érdekes módon a maxadilannak nincs hatása az említett receptorokra. [1]

Maxadilan

CDATCQFRKAIDDCQKQAHHSNVLQTSVQTTATFTSMDTSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA

PACAP1-38

HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKNK

PACAP1-27

HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVL

VIP

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN

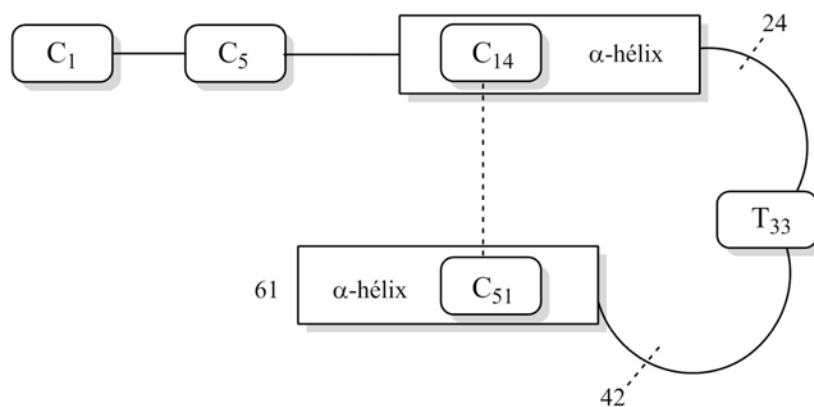
2. ábra

Szekvencia homológia

A PACAP számos fontos élettani hatással rendelkezik az élő szervezetben, amelyek közül a következőket említeném: neurotranszmitter, neuromodulátor, neuroprotektív, szerepe van a reprodukcióban, valamint az emésztőtraktusban is előfordul.

2. A MAXADILAN SZERKEZETE

A maxadilan egy 61 aminosavból álló polipeptid, amely 4 ciszteint tartalmaz 1, 5, 14 valamint 51 pozícióban, amelyek az 1-5 valamint 14-51 helyzetben található diszulfid hidakat alkotják. A peptid másodlagos szerkezete két α -hélix között elhelyezkedő β -redő alakzattal jellemezhető.



3. ábra
A maxadilan peptid szerkezete

A szerkezet-aktivitás kapcsolat vizsgálata során számos maxadilan módosítás készült el, valamint számos természetben előforduló variánst vizsgáltak, amelyekből az alábbi következtetések vonhatók le:

- 1-5 diszulfid híd nem szükséges az agonista aktivitásához, de a 14-51 diszulfid híd módosításával elvész az aktivitás
- a β -redőben a 24-42 pozíció közötti szekvencia rész törlésével egy specifikus PAC1 receptor antagonistá, a Maxa65 állítható elő
- a C-terminális részen elhelyezkedő lizinek kezdeményezik a kölcsönhatást a PAC1 receptorral, míg a treonin-33 felelős a receptor aktiválásért. [2]

3. CÉLKITŰZÉS

Korábbi munkáink során előállítottuk a PACAP 1-38, 1-27 peptideket, illetve a 6-38 és 6-27 nem szelektív antagonistákat. A PAC1 receptor szelektív aktivitásvizsgálatára célul tűztük ki a Maxa61 mint PAC1 agonista, illetve Maxa65 mint PAC1 antagonistá peptidek előállítását, valamint tömegspektrometriás szerkezetigazoló vizsgálatait. A Maxa61 és Maxa65 vizsgálatával feltérképezhetjük az említett peptidek és a PAC1 receptor közötti kölcsönhatásokat.

4. SZINTETIKUS RÉSZ

4.1. A Maxadilan előállítása

A Maxa61 peptid szintézise szilárd fázisú peptid szintézis segítségével, Fmoc-védőcsoport stratégiát alkalmazva CEM Liberty automata peptid szintetizátor (CEM Liberty® Microwave Peptide Synthetiser) felhasználásával valósult meg. Az alkalmazott gyanta Tenta-Gel R-Ram, amelynek boritottsága 0,19 mmol/g, az előállítandó peptid mennyisége 0,1 mmol.

A Maxa61 szekvenciájának bonyolultsága és hosszúsága miatt, a szintézis során két különböző szekvencia résznél próbahasítást végeztünk a szekvencia ellenőrzése végett. A nyers peptid vizsgálata Agilent 1200 típusú RP-HPLC segítségével történt, Phenomenex Jupiter 10 μ C18 300A töltetű oszlop felhasználásával.

- hasítási körülmények: 5ml hasító elegy, 3,5 óra
- hasító elegy: TFA 88%, víz 10%, TIS 2%, DTT 5%
- eluens: (A) 0.1% TFA and (B) 80% MeCN, 0.1% TFA
- gradiens: 5-80% (B), 25 perc, 1,2 ml/perc, 220 nm

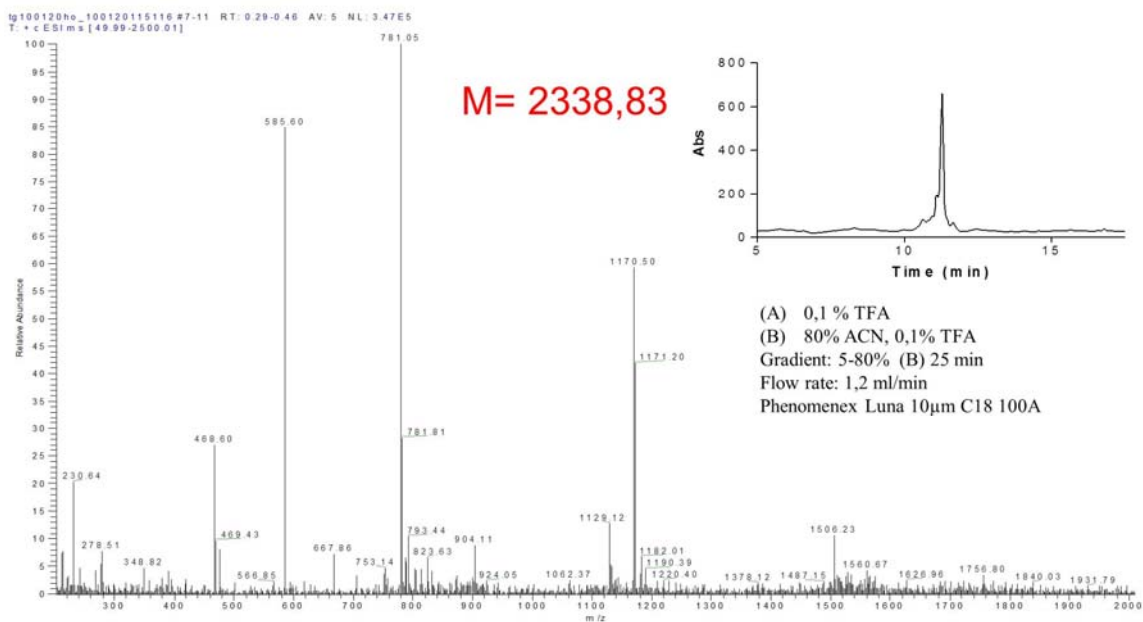
LPGNSVFKECMKQKKKEFKA-NH₂
(M = 2338,83)

NVLQTSVQTTATFTSMDTSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA-NH₂
(M = 4481,14)

CDATCQFRKAIDDCQKAHHSNVLQTSVQTTATFTSMDTSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA-NH₂
(M = 6869,76)

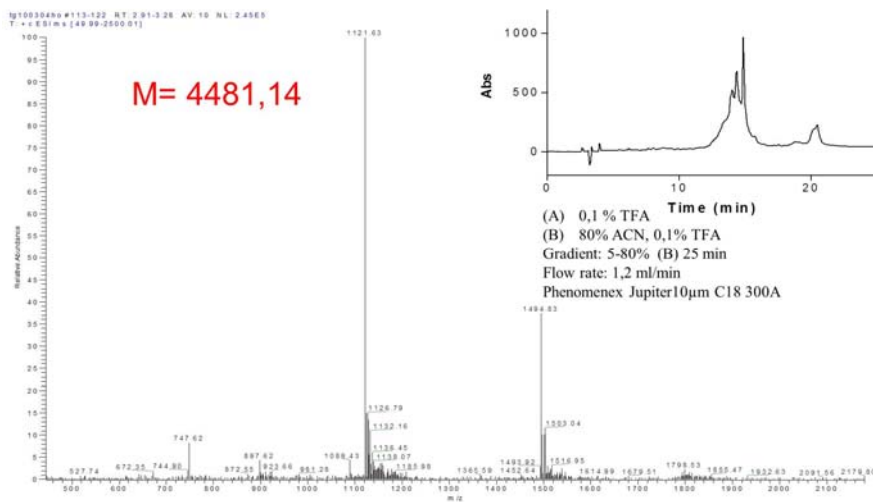
4. ábra
Ellenőrzött fragmensek

Az első próbahatás és ellenőrzés 20 aminosav kapcsolása után történt. Az ellenőrzött fragmens szekvenciája: LPGNSVFKECMKQKKKEFKA, M= 2338,83



5. ábra
LPGNSVFKECMKQKKKEFKA nyers fragmens kromatogramja, valamint tömegspektruma

A második próbahatás valamint ellenőrzés 40 aminosav kapcsolása után következett be. Az ellenőrzött fragmens szekvenciája: NVLQTSVQTTATFTSMDTSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA, M= 4481,14



6. ábra

NVLQTSVQTTATFTSMDSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA nyers fragmens kromatogramja, valamint tömegspektruma

A szintézis végeztével az elkészült peptid gyantáról való hasítása az előbbieken feltüntetett módon történt, majd az így előállított 56 mg nyers Maxadilan peptid tisztítása preparatív Knauer HPLC segítségével valósult meg.

Tisztítási körülmények:

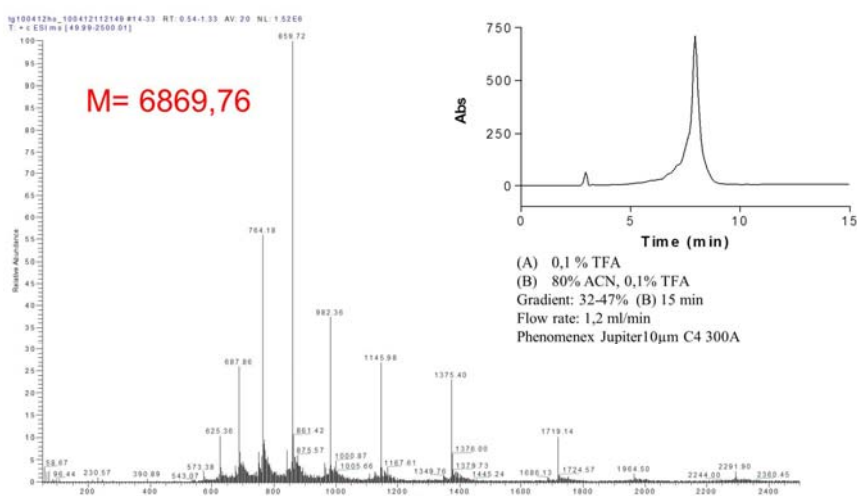
- eluens: (A) 0.1% TFA, (B) 80% MeCN, 0.1% TFA
- gradiens: 0-20% (B) 5 perc, 20-60% (B) 85 perc lineáris gradiens, 4.0 ml/perc áramlási sebesség, 220 nm, Phenomenex Jupiter 10µ C4 300A, 250 x 21 mm

A nyers peptid RP-HPLC tisztítása valamint liofilizálása után a tisztított Maxa61 tömege: 4 mg

Az előállított Maxa61 szekvenciája:

CDATCQFRKAIDDCQKQAHHSNVLQTSVQTTATFTSMDSQLPGNSVFKECMKQKKKEFKA,

M= 6869,76



7. ábra

A tisztított Maxa61 peptid kromatogramja, valamint tömegspektruma

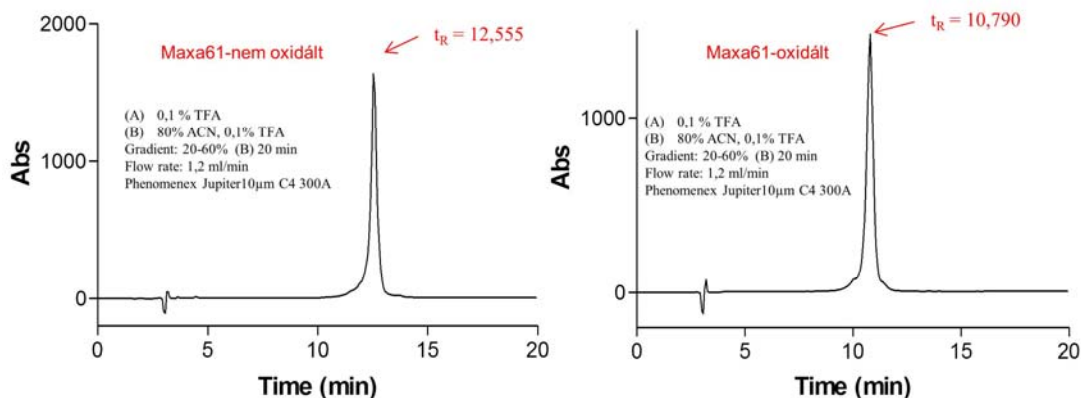
A Maxa61 CEM Liberty automata peptid-szintetizátor segítségével történő szintézisének végeztével, következetesként elmondhatjuk, hogy az első ellenőrzött nyers fragmens kromatogramja (20 aminosav kapcsolása után) valamint tömegspektruma optimálisnak tekinthető, minimális mellékreakciók keletkezése mel-

lett. A következő ellenőrzött nyers fragmens (40 aminosav kapcsolása után) kromatogramjában, valamint tömegspektrumában viszont melléktermékek keletkezését figyelhetjük meg, ami megnehezítette a következő 21 aminosav kapcsolását. Tekintve a szintézis következtében felmerülő nehézségeket valamint a szerény termelést, a továbbiakban a Maxa61 polipeptid előállítására egy új szintézis-stratégiát dolgoztunk ki.

A Maxa61 előállítása után a diszulfid hidak kialakítása következett. Erre a célra a már jól ismert jódos oxidációs eljárást alkalmaztuk. A Maxa61 nyers peptid (0,0073 mmol, 50 mg) vizes oldatát jód/ aceton oldattal (50 ml) színállandóságig titráltuk, a reakció előrehaladását RP-HPLC segítségével követtük. A nyers, oxidált Maxa61 RP-HPLC tisztítását követően, a tisztított anyag tömege: 2 mg.

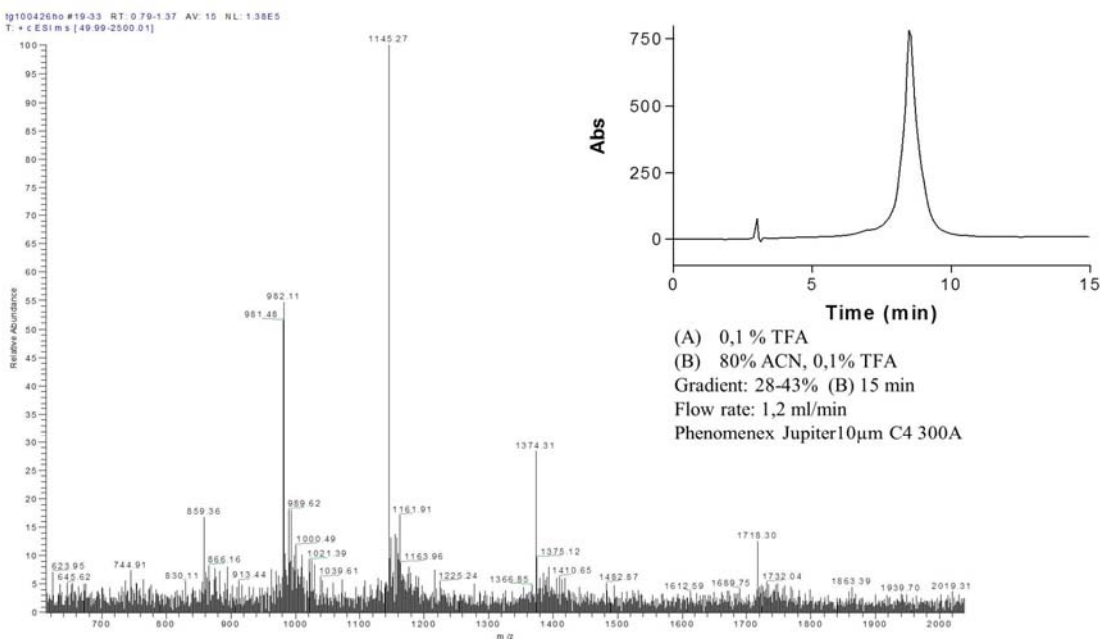
Tisztítási körülmények:

- eluens: (A) 0.1% TFA, (B) 80% MeCN, 0.1% TFA
- gradiens: 0-20% (B) 5 perc, 20-60% (B) 85 perc lineáris gradiens, 4.0 ml/perc áramlási sebesség, 220 nm, Phenomenex Jupiter 10 μ C4 300A 250 x 21 mm



8. ábra

A tisztított, nem oxidált Maxa61 (bal oldal), valamint a tisztított, oxidált Maxa61 (jobb oldal)



9. ábra

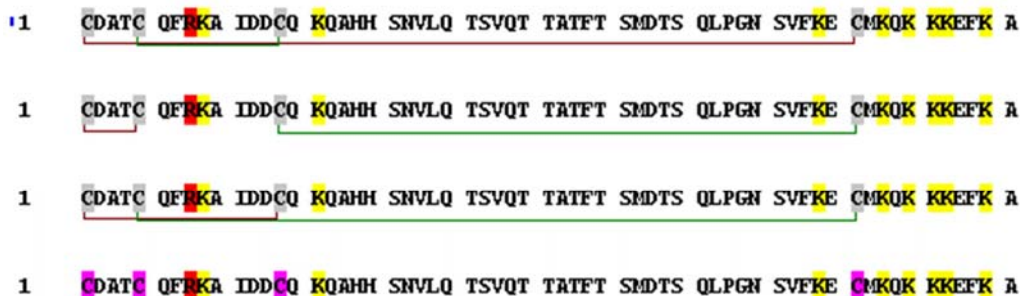
A tisztított, oxidált Maxa61 peptid kromatogramja, valamint tömegspektruma

4.2. A diszulfid hidak helyzetének igazolása

Mivel a Maxa61 peptid négy cisztein egységet tartalmaz 1, 5, 14, 51 helyzetben, az oxidációs lépést követően a két diszulfid híd három különböző variációban alakulhatott ki.

Average Mass = 6865.8202, Monoisotopic Mass = 6861.2652

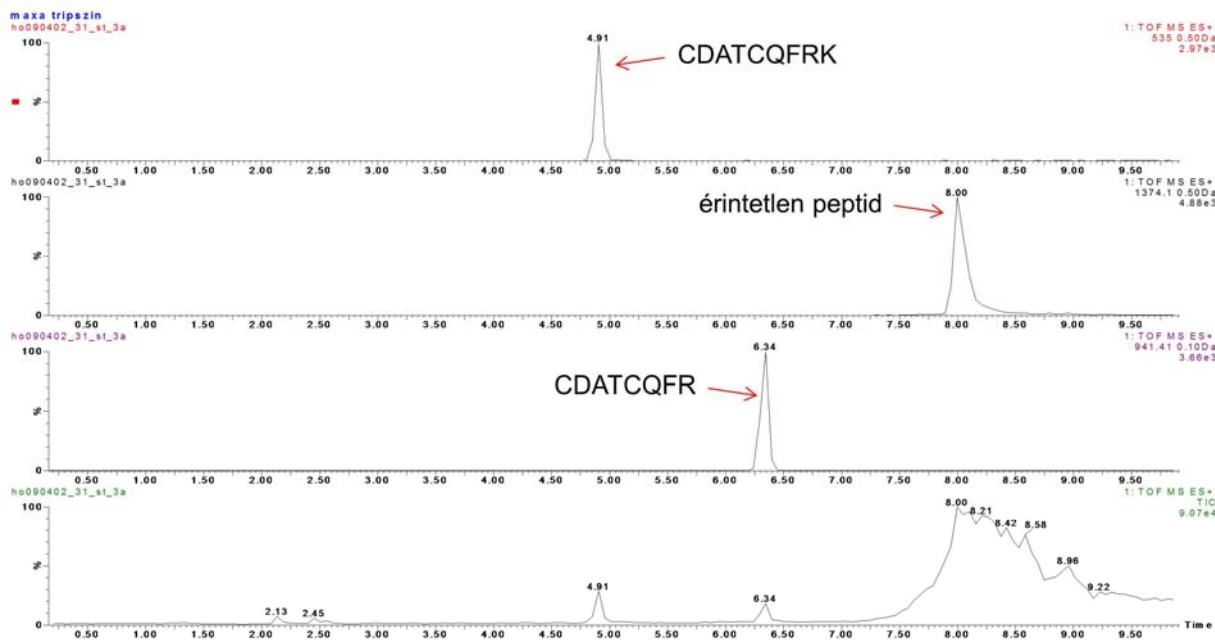
N-Terminus = H, C-Terminus = NH2



10. ábra

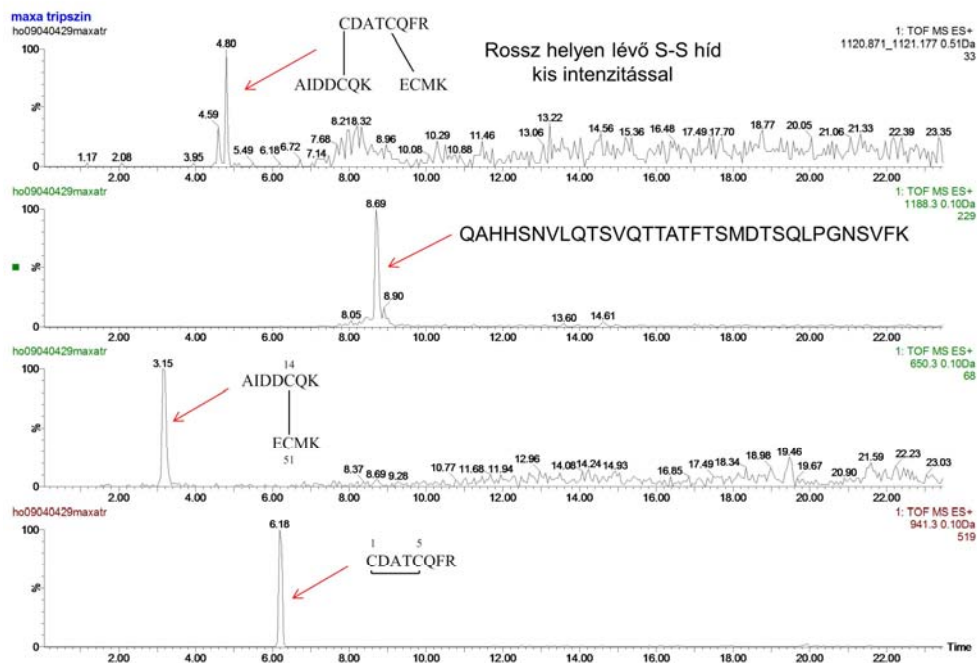
A diszulfid hidak kialakulásának lehetőségei

Annak érdekében, hogy meggyőződjünk arról, hogy a diszulfid hidak a megfelelő pozíciókban, az 1-5 illetve 14-51 helyzetben lévő ciszteinek között alakultak ki, a Maxa61 peptidet tripszines emésztésnek vetettük alá, majd a diszulfid hidat tartalmazó peptid fragmenseket egy tömegspektrométerhez kapcsolt RP-HPLC segítségével vizsgáltuk.



11. ábra

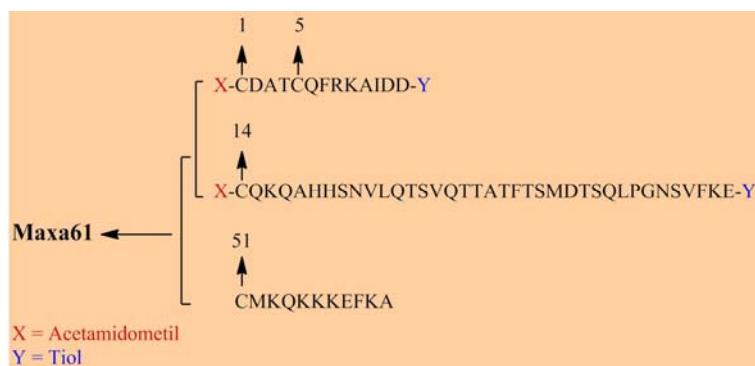
Az érintetlen peptid, valamint diszulfid hidat tartalmazó fragmensek tömegkromatogramjai



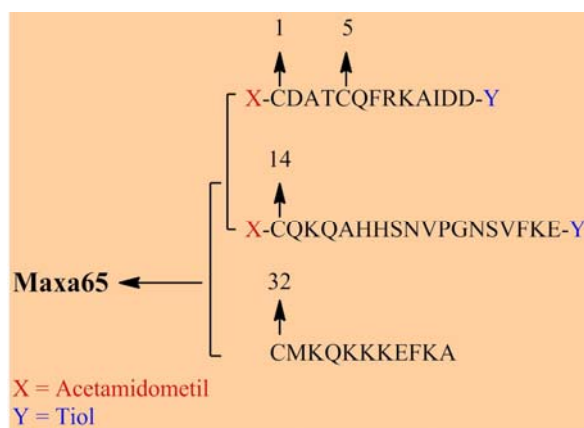
12. ábra
Hosszú tripszines hidrolízis után készített tömegkromatogramok

5. FOLYAMATBAN LÉVŐ SZINTÉZISEK, TOVÁBBI TERVEK

Tekintve a Maxa61 peptid szekvenciájának bonyolultságát illetve a szekvencia hosszúságát valamint a Maxa61 szilárd fázison történő szintézise során bekövetkezett nehézségeket, egy új, többlépéses szintézis tervet dolgoztunk ki a Maxa61 valamint a Maxa65 peptid előállítására. A szintézishez MBHA gyantát (0,6 mmol/g) választottunk, amelyre első aminosavként egy Fmoc-ciszteint (Fmoc-Cys-Trt-OH) kapcsolunk. A kapcsolást követően a Fmoc-amino védőcsoportot eltávolítottuk piperidin/DMF felhasználásával, majd a szabadon maradt aminosoprotot ecetsavanhidrid segítségével acileztük. A következő lépésben a cisztein oldal-láncában lévő tritil védőcsoportot eltávolítottuk TFA/H₂O/DTT segítségével, majd az adott fragmens szintézisét a szabadon maradt tiol csoporton folytattuk, Boc szintézisstratégiát alkalmazva. Az említett védőcsoport stratégiát alkalmazva, szilárd fázisú peptidszintézis segítségével előállított peptid fragmenseket, natív kémiai ligáció segítségével egymáshoz kapcsoljuk, majd a megfelelő oxidációs lépést követően előállítjuk a Maxa61 és Maxa65 peptideket. [3] Az előállított peptid fragmensek natív kémiai ligációval való egymáshoz kapcsolása jelenleg folyamatban van.



13. ábra
A Maxa61 peptid szintézise natív kémiai ligáció segítségével



14. ábra

A Maxa65 peptid szintézise natív kémiai ligáció segítségével

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Szilárd fázisú peptidszintézis segítségével, a megfelelő védőcsoport stratégia alkalmazásával előállítottuk a Maxa61 (PAC1 agonista) 61 aminosavból álló, két diszulfid hidat tartalmazó peptidet, majd az ezt követő oxidációs lépés során a megfelelő helyen kialakuló diszulfid hidak jelenlétét tömegspektrometriás módszer segítségével igazoltuk.

A Maxa65 (PAC1 antagonist) szilárd fázisú szintézise, valamint szerkezetigazoló analitikai vizsgálatai jelenleg folyamatban vannak.

7. RÖVIDÍTÉSEK

TFA – trifluorecetsav; TIS – triizopropil-szilán; DTT – ditiotreitól; MeCN – acetonitril; DMF – dimetil-formamid; Fmoc – 9-fluorenil-metiloxi-karbonil; Boc – terc-butil-oxi-karbonil; MBHA – 4-metil-benzhidril-amin

FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] Ethan A. Lerner, Aurel O. Iuga, Vemuri B. Reddy; *Peptides* 28 (2007), 1651–1654
- [2] Vemuri B. Reddy, Yhong Li, Ethan A. Lerner; *J Mol Neurosci* (2008), 36, 241–244
- [3] Györgyi Váradi, Gábor K. Tóth, Zoltán Kele, László Galgóczy, Ádám Fizil, Gyula Batta; *Chem. Eur. J.* (2013), 19, 12684–12692

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0047